



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

RAPHAEL CARVALHO E SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RANK, RANKL E OPG NAS DOENÇAS
PERI-IMPLANTARES**

Ribeirão Preto

2019

RAPHAEL CARVALHO E SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RANK, RANKL E OPG NAS DOENÇAS
PERI-IMPLANTARES**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências na Área de Concentração em Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz

Co-orientador: Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Junior

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RAPHAEL CARVALHO E SILVA

FICHA CATALOGRÁFICA

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação
do Serviço de Biblioteca**

Silva, Raphael Carvalho e

Associação do polimorfismo RANK, RANKL e OPG nas doenças peri-implantares. Ribeirão Preto, 2019.

71p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) – Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz

Co-orientador: Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Junior

1. Implantes Dentários.
2. Radiografia Periapical.
3. Perda Óssea Alveolar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva, RC. **Associação do polimorfismo RANK, RANKL e OPG nas doenças peri-implantares.** Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - 2019.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Aprovado em: / / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Orientador Prof(a). Dr(a).: _____

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

RAPHAEL CARVALHO E SILVA

Nascimento 02 de maio de 1979 - Itamogi/Minas Gerais

Filiação José Victor da Silva
Noêmia Aparecida de Carvalho e Silva

1999/2004 Curso de Odontologia da Universidade Franca.

2004/2006 Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial na
Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS.

Dedicat6rias

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, **Noêmia** e **José Victor**, que sempre se doaram por completo e renunciaram aos seus sonhos, para que eu e minhas irmãs pudéssemos realizar os nossos e chegar onde estamos. Certamente esta conquista, assim como todas as outras, não é minha, mas nossa. Tudo o que consegui só foi possível pela formação pessoal que recebi de vocês, sempre baseada em amor, compreensão, moral, ética e pela forma como me ensinaram a enxergar a vida e o próximo.

As minhas irmãs, **Renata**, **Lívia**, meus sobrinhos **Arthur**, **Raphaela** e **Eduardo**, vocês são a razão da minha vida, agradeço pelo carinho e amizade incondicional. A vocês todo meu coração e minha eterna gratidão!

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Antes e acima de tudo, agradeço a **Deus**, Pai de amor e bondade, pela vida, por me abençoar, iluminar meus caminhos, pelas vitórias até então alcançadas, e pela força para seguir em frente sempre!

Meu muito obrigado aos meus queridos amigos, **Dr. Tadeu Borges**, **Dra. Zobelía Borges** e **Msc. Luan Borges**, exemplos de amor, compromisso e dedicação a ã odontologia. Obrigado por sempre buscarem a excelência em nossa profissão e promoverem a continua melhora da odontologia amazonense. Minha eterna gratidão por terem me acolhido desde a chegada em Manaus, por sempre acreditarem na minha capacidade, dedicação e pela significância ímpar na minha trajetória profissional.

A minha orientadora, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, e co-orientador, **Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Junior**, os quais muito admiro. Pois são exemplos de dedicação, competência, inteligência e honestidade. Sempre estiveram presente para ensinar e orientar. Professores, muito obrigado!

A **Dra. Marília Reis**, **Dra. Juliana** e **Dr. Guido Artemio**, pelos momentos de aprendizagem, competência, pela sua ajuda e disponibilidade sempre que precisei. Serei eternamente grato, muito obrigado!

A **Profª. Dra. Érika Calvanho Kuchler**, pelos momentos de aprendizagem e convivência harmoniosa, sou um grande admirador do seu trabalho. Gratidão por tudo!

Agradecimientos

A universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan** e Vice-Reitor, **Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes**.

A faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e Vice-Diretor, **Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Junior**.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Andíara de Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profª. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Adilson Thomazinho**, **Profª. Dra. Míriam Aiko Nakane Matsumoto** e **Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní**, pelos ensinamentos, orientações, privilégio em poder conhecê-los e participar do desenvolvimento do DINTER Faculdade de Odontologia-IAES/ FORP-USP, por terem enfrentado distância, diferenças regionais para partilhar conosco os conhecimentos, experiências e nos motiva para pesquisa e extensão. O saber transmitido, as palavras de incentivo, as opiniões e as críticas foram fundamentais para meu crescimento e concretização desta dissertação.

“Ninguém escapa do sonho de voar, de ultrapassar limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda”
Antoine de Saint-Exupère

Aos professores membros da banca do meu exame de qualificação **Prof. Dr. Léia Assed Bezerra** e **Prof. Dr. Paulo Nelson**.

Ao **Dr. Tađeu Borges** por sempre buscar a excelência na nossa profissão e promover a contínua melhora na odontologia amazonense, por ter aproximado e acreditado no DINTER Faculdade de Odontologia-IAES/ FORP-USP, mostrando o compromisso e a dedicação à odontologia.

Aos **professores** que estarão presentes na minha defesa de tese de doutorado.

Aos **pós-graduandos do Programa-Graduação em Odontopediatria** do DINTER Faculdade de Odontologia – IAES/ FORP-USP, pelo companheirismo constante e convivência agradável.

À Família **RC ODONTOLOGIA/AM**, por estarem acompanhando essa jornada, protegendo e me fortalecendo com suas orações. O seu apoio e companheirismo contribuíram para a realização desse trabalho e fazem com que essa clínica seja um orgulho para todos nós.

Ao meus queridos amigos que a profissão me presenteou **Marcio Langbeck** e **Lizete Figueiras** por estar sempre perto, incentivando, com seu bom-humor me fez rir em momentos difíceis, e ao mesmo tempo com sua seriedade profissional contribuiu para a realização deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade que acontecem”. Por isso existem momentos inexplicáveis e pessoas incomparáveis. Fernando Pessoa

À **Secretária do Programa de Pós Graduação em Odontopediatria**, e aos demais funcionários pela enorme disponibilidade para ajudar sempre.

A todos os **funcionários** da Faculdade do Amazonas-IAES pela competência e dedicação.

RESUMO

Silva, RC. **Associação do polimorfismo RANK, RANKL e OPG nas doenças peri-implantares.** [tese]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A reabilitação por meio de implantes osseointegrados vem tornando-se uma atividade crescente na odontologia. Hoje em dia a taxa de sucesso vem aumentando devido às novas técnicas e tecnologias, porém a perda do implante dentário decorrente das doenças peri-implantares tem se tornado um problema frequente na prática clínica. Contudo não há relação direta com os fatores de risco, até o momento relatado na literatura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação dos genes RANK, RANKL E OPG no desenvolvimento das doenças peri-implantares na Clínica de Especialização em Implantodontia na Faculdade do Amazonas – IAES. Cento e quatorze pacientes submetidos a instalação de implantes osseointegráveis foram incluídos na pesquisa. A avaliação clínica incluiu a análise das condições de saúde do paciente e do tecido peri-implantar através de mensuração da profundidade clínica de sondagem, presença de sangramento espontâneo, fenótipo peri-implantar, supuração, placa bacteriana e coloração gengival. Radiografias padronizadas avaliaram a altura do osso peri-implantar. A amostra (n=114) foi dividida em 3 grupos: A (saúde peri-implantar), B (mucosite) e C (peri-implantite). Amostras de saliva foram coletadas para avaliação da presença de polimorfismo nas regiões promotoras dos genes das osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) e receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANK) por meio da técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que dos 114 indivíduos incluídos no presente estudo, 71 apresentavam uma condição periimplantar saudável e 43 uma doença (30 com mucosite e 13 com peri-implantite). Idade, biótipo peri-implantar, diabetes e presença de placa peri-implantar foram associados à mucosite, enquanto idade, biótipo peri-implantar, tabagismo e etilismo, doença periodontal e placa peri-implantar foram associados à presença de periimplantite ($P \leq 0,05$). Não houve associação entre a condição perimplantar e qualquer polimorfismo avaliado nos genes RANK, RANKL ou OPG ($P > 0,05$). Conclui-se que os genes RANK, RANKL e OPG não apresentaram relação com o desenvolvimento das doenças peri-implantares.

Palavras-Chave: Implantes Dentários. Radiografia Periapical. Perda Óssea Alveolar.

ABSTRACT

Silva, RC. **Association of RANK, RANKL and OPG polymorphisms in peri-implant diseases.** [thesis]. Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Rehabilitation through osseointegrated implants has become a growing activity in dentistry. Nowadays, a success rate due to new techniques and technologies, however, the loss of dental implants due to peri-implant diseases has become a frequent problem in clinical practice. There is no direct connection with the risk factors, until now reported. The present work makes an evaluation of the RANK, RANKL and OPG genes in the development of the peri-implant clinics at the Implantology Specialization Clinic at the Faculty of Amazonas - IAES. One hundred and fourteen patients with an implant installation were included in the study. The clinical evaluation included the analysis of the peri-implant patient and non-tissue health conditions by measuring the clinical depth of survey, presence of spontaneous bleeding, peri-implant phenotype, suppuration, plaque and gingival staining. Standardized radiographs assessed the height of the peri-implant bone. A sample (n = 114) was divided into 3 groups: A (peri-implant health), B (mucositis) and C (peri-implantite). Saliva samples were collected for the presence of polymorphism in the promoter regions of the osteoprotegerin (OPG) genes, the Kappa nuclear factor activator receptor (RANKL) and the nuclear kappa factor activator receptor (RANK) by the PCR technique in real time. The results showed that of the 114 individuals in the study, 71 had a healthy peri-implant condition and 43 a diseased condition (30 with mucosites and 13 with peri implantite). Age, peri-implant biotype, diabetes and presence of peri-implant plaques were associated with mucositis, while age, peri-implant biotype, smoking and alcoholism, periodontal and peri-implant plaques were associated with the presence of peri-implantitis ($P \leq 0.05$). There was no association between the perimplant condition and any polymorphism evaluated in the genes: RANK, RANKL or OPG ($P > 0.05$). It is concluded that the RANK, RANKL and OPG genes are not related to the development of peri-implant diseases.

Keywords: Dental implants. Periapical Radiography. Alveolar Bone Loss.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. PROPOSIÇÃO	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Amostra	39
3.2 Métodos de Avaliação	40
3.2.1 Avaliação Clínica	40
3.2.1.2 Avaliação Radiográfica	40
3.2.2 Processamento laboratorial	40
3.2.2.1 Coleta do material biológico.....	40
3.2.2.2 Extração do DNA.....	41
3.2.2.3 Avaliação da quantidade e da pureza do DNA	41
3.2.2.4 Seleção dos Polimorfismos e Genotipagem	42
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67

1. *Introdução*

1. INTRODUÇÃO

Os implantes dentários tornaram-se uma alternativa terapêutica para pacientes parcial ou totalmente edêntulos. O sucesso do tratamento baseia-se no processo de osteointegração, no qual o implante passa a ser suportado pelo tecido ósseo recém-formado na ausência de tecido fibroso. As falhas tardias dos implantes dentários são responsáveis pela maioria dos casos de perda do implante e frequentemente associadas às infecções bacterianas, como a peri-implantite (Hanaoka, 2014).

As lesões peri-implantares são, geralmente, assintomáticas e diagnosticadas em consultas de rotina e manutenção. Essas podem se desenvolver após alguns anos em função dos implantes. Em base nos achados clínicos e exames radiográficos são indispensáveis para diferenciar as doenças peri-implantares – mucosite e peri-implantite – e definir qual o melhor tratamento (Klinge, Gustafsson & Berglundh, 2002).

Mucosite peri-implantar é a presença de inflamação reversível na mucosa ao redor do implante sem sinais de perda de suporte ósseo. A etiologia da mucosite é multifatorial e está relacionada, principalmente, com a higiene bucal deficiente, histórico de doença periodontal, fumo, diabetes e álcool. A mucosite peri-implantar pode ser identificada clinicamente por vermelhidão e inchaço dos tecidos moles, mas o sangramento à sondagem é atualmente reconhecido como a característica mais importante (Heitz-Mayfield, 2008; Lindhe & Meyle, 2008; Smeets et al., 2014).

Em contraste com a mucosite, a peri-implantite é uma doença progressiva e irreversível dos tecidos duros e moles que envolve o implante e é acompanhada de reabsorção óssea. A lesão da mucosa é frequentemente associada a supurações e bolsas profundas, mas sempre acompanhada de perda de osso marginal (Albrektsson & Isidor, 1994; Claffey et al. 2008; Lindhe & Meyle, 2008; Smeets et al., 2014).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento das doenças peri-implantares são relatados na literatura: tabagismo, história de periodontite, falta de higiene bucal, doenças sistêmicas (diabetes descompensada, doença cardiovascular e imunossupressão), causas iatrogênicas e alcoolismo. Estudos indicam que o tabagismo é o maior fator de risco identificável e mais frequentemente citado para a doença peri-implantar, seguido por uma história de periodontite (Chrcanovic, Albrektsson e Wennerberg, 2014; Jepsen et al., 2015; Ogata et al., 2017; Smeets et al., 2014).

Heitz-Mayfield (2008) realizou uma revisão de literatura sobre doenças peri-implantares: diagnóstico e indicadores de risco. Estudos experimentais e clínicos identificaram vários critérios diagnósticos, incluindo parâmetros de sondagem, avaliação radiográfica e análise de líquido e saliva crevicular peri-implantar. Análises transversais investigaram indicadores potenciais de risco para doenças peri-implantares, incluindo má higiene bucal, tabagismo, história de periodontite, diabetes, características genéticas, consumo de álcool e superfície do implante. Há evidências de que a sondagem utilizando uma força leve (0,25 N) não danifica os tecidos peri-implantares e que o sangramento à sondagem (BOP) indica a presença de inflamação na mucosa peri-implantar. A profundidade de sondagem, a presença de BOP e supuração devem ser avaliadas regularmente para o diagnóstico de doenças peri-implantares. Radiografias são necessárias para avaliar os níveis de suporte ósseo ao redor dos implantes. A revisão identificou fortes evidências de que a má higiene bucal, a história de periodontite e o tabagismo são indicadores de risco para a doença peri-implantar.

Os genes RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa β), RANKL (Ligante do Receptor do Fator Nuclear kappa β) e OPG (osteoprotegerina) são genes potencialmente candidatos às doenças peri-implantares (Spelling, 2008).

O RANK e seu ligante RANKL são identificados como protagonistas na diferenciação dos osteoclastos. RANK é um receptor de citocinas transmembranar nos osteoclastos que é responsável, por meio da união com seu ligante RANKL, pela osteoclastogênese, com transformação dos osteoclastos em osteoclastos ativos. A regulação da remodelação óssea via osteoclastos é uma das funções essenciais, embora não exclusivas, de RANK e RANKL (Melesse et al., 2014).

Por outro lado, a osteoprotegerina é uma proteína solúvel cuja estrutura é semelhante à do RANK, o que lhe permite ligar-se a RANKL e impedir a ligação RANK/RANKL podendo, assim, bloquear o efeito indutor de osteoclastogênese (Oliveira et al., 2016).

O sistema RANK / RANK-L / OPG participa da regulação da atividade osteolítica em condições normais, e sua alteração está associada a várias condições patológicas, incluindo destruição óssea associada ao crescimento tumoral. A interação entre RANK e RANK-L desempenha um papel crítico na produção, diferenciação e ativação de osteoclastos, o que leva à reabsorção óssea (González-Galván et al., 2018).

Duarte et al. (2009) avaliaram a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias [IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-4 e IL-10] e fatores relacionados à osteoclastogênese (RANKL e OPG) em locais que exibem diferentes gravidades da doença

peri-implantar inflamatória. Biópsias de tecido mole peri-implantar (n = 48) foram colhidas de implante sadio (HI), mucosite (MC), peri-implantite inicial (IP) e locais com peri-implantite (SP) severas. Os resultados mostraram que os níveis de mRNA de IL-12 e TNF- α foram maiores em SP, seguido por IP e MC (P <0,05). IL-4 foi maior no HI, seguido por MC, SP e IP (P <0,05). A IL-10 foi a menor em HI, enquanto não foram detectadas diferenças entre os grupos doentes (P > 0,05). Os níveis de mRNA da OPG foram maiores no HI, seguido pelo IP, SP e MC, enquanto o RANKL foi aumentado à medida que a gravidade da peri-implantite aumentou (P <0,05). A maior razão OPG / RANKL foi observada no HI e a menor no SP (P <0,01). Por meio desses achados conclui-se que expressões de fatores relacionados a inflamação e osteoclastogênese podem ter um papel importante no surgimento e na gravidade das doenças peri-implantares.

A remodelação óssea é regulada por um processo altamente dinâmico envolvendo os osteoblastos, formadores de tecido ósseo, e os osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo. A coordenação entre osteoclastos e osteoblastos é fundamental para a remodelação óssea fisiológica. A osteoclastogênese também é conhecida por ser de grande importância durante o desenvolvimento esquelético na infância e na manutenção do esqueleto na fase adulta (Behera et al., 2016). O osso remodela-se continuamente para se adaptar às influências do crescimento e às alterações nas cargas mecânicas, mantendo a homeostase mineral e regulando o ambiente da medula óssea. No esqueleto maduro, a remodelação óssea, além de ser uma fonte de cálcio e fosfato sistêmico, é um meio de substituição de osso danificado por osso sadio (Consolaro, 2009; Boyce et al., 2012).

Até há pouco tempo, considerava-se que as células osteoblásticas eram as células dominantes que regulavam a remodelação óssea. No entanto, tornou-se cada vez mais evidente que as células osteoclásticas desempenham papéis importantes na regulação de osteoblastos e de outras células no microambiente ósseo. Os osteoclastos, ativados pela ligação RANK/RANKL, durante a reabsorção óssea liberam fatores de crescimento, incluindo TGF- β , fatores de crescimento semelhantes à insulina e as proteínas morfogenéticas, que estimulam a diferenciação de osteoblastos e a neoformação óssea (Xing et al., 2012).

Boyce et al. (2012) realizaram uma revisão de literatura sobre a biologia dos osteoclastos que influencia nas doenças ósseas, como a osteoporose, bem como tratamentos para doenças ósseas que estão disponíveis ou em desenvolvimento. O remodelamento ósseo mantém a integridade esquelética dos osteoclastos, removendo focos de osso lesado e osteoblastos, substituindo-os por osso novo. Doenças associadas ao aumento da reabsorção

óssea têm maior remodelação, frequentemente com formação óssea inadequada e aumento do risco de fratura. Os mecanismos moleculares que regulam as funções dos osteoclastos e dos osteoblastos foram melhor compreendidos nos últimos 20 anos e levaram ao questionamento da noção de que as células osteoblásticas têm o papel regulador dominante sobre as células osteoclásticas na remodelação óssea. A formação e funções dos osteoclastos são regulados por citocinas, especialmente o receptor ativador do ligante NF- κ B (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). A diferenciação, atividade e ciclo de vida dos osteoclastos são regulados em parte por outras células que residem dentro do osso. Estes incluem osteoblastos, osteócitos e células imunes, que expressam essas citocinas em resposta à maioria dos fatores que promovem a reabsorção óssea. RANKL e M-CSF ativam numerosas vias de sinalização, que são alvos potenciais para intervenção terapêutica. É importante ressaltar que as células osteoclásticas também funcionam como reguladores positivos e negativos da formação óssea osteoblástica. Os autores concluíram que existem múltiplos alvos dentro dos osteoclastos para intervenção farmacológica para prevenir a perda óssea na osteoporose e outras doenças ósseas reabsortivas. No entanto, novas terapias também podem afetar as funções das células osteoblásticas.

Em decorrência do maior número de implantes dentários instalados nas últimas décadas, as doenças peri-implantares tem se tornado um problema frequente na prática clínica e tem demandado atenção de pesquisadores e clínicos da área odontológica. Cabe ainda ressaltar que as doenças peri-implantares são infecto-inflamatórias onde a suscetibilidade do hospedeiro desempenha um papel fundamental na sua etiologia. Desta forma são necessários novos estudos que avaliem biomarcadores genéticos como os polimorfismo nos genes que codificam RANK, RANKL e OPG envolvidos na patogênese das doenças peri-implantares.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar a associação dos polimorfismos nos genes RANK, RANKL e OPG no desenvolvimento das doenças peri-implantares em pacientes de Manaus .

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo clínico, radiográfico e laboratorial deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense CAAE nº 0061.0.258.000-07 e os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa.

3.1 Amostra

Pacientes submetidos à instalação de implantes dentários osseointegráveis na Clínica de Especialização em Implantodontia na Faculdade do Amazonas – IAES na cidade de Manaus – Amazonas.

Os pacientes foram submetidos à anamnese, sendo preenchidas fichas para identificação, história médica odontoestomatológica, incluindo história de doença periodontal pregressa, condição geral de saúde, uso de medicamentos, hábitos, exame clínico extra e intra-bucal e odontograma. Foram solicitados exames laboratoriais, incluindo hemograma completo, coagulograma, glicose, uréia e creatinina.

Foram incluídos na pesquisa os pacientes com no mínimo um implante endósseo instalado na cavidade bucal. Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), concordando em participar da pesquisa.

Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram doença peri-implantar ou perda do implante, antes do período de osseointegração.

Todos os pacientes foram submetidos à análise radiográfica através de radiografia periapical completa. De acordo com as características do tecido peri-implantar e com os achados radiográficos, os pacientes foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi caracterizado como saúde peri-implantar, o segundo grupo foi caracterizado por inflamação no tecido gengival (mucosite), sem perda óssea radiográfica e o terceiro grupo incluiu pacientes com perda óssea peri-implantar (peri-implantite). O paciente que apresentou mais de um implante instalado foi incluído no grupo de acordo com o tecido peri-implantar com maior grau de doença. No entanto, o relato da condição ao redor dos outros implantes foi sempre considerada.

Pacientes com doença sistêmica, fumantes, etílicos e com pobre higiene bucal foram incluídos no trabalho como forma de avaliar o efeito desses fatores ambientais no resultado investigado bem como sua interação com genes.

Todos os pacientes incluídos na pesquisa foram submetidos à avaliação clínica e radiográfica, e reavaliados 12 meses após a primeira avaliação.

3.2 Métodos de Avaliação

3.2.1 Avaliação Clínica

A avaliação clínica incluiu análise da condição geral de saúde do paciente e das condições no tecido peri-implantar através de exames clínicos. O tecido peri-implantar foi clinicamente avaliado quanto à coloração gengival, presença de sangramento à sondagem, sangramento espontâneo, fenótipo peri-implantar (0= fino; 1=espesso), supuração e biofilme bacteriano (0= ausência de biofilme bacteriano; 1= presença de biofilme bacteriano). A profundidade clínica de sondagem foi mensurada nos aspectos vestibular, lingual/palatino, mesial e distal, utilizando sonda milimetrada CT15 (Anexo II).

3.2.1.2 Avaliação Radiográfica

Os implantes foram radiografados utilizando radiografia periapical e posicionador radiográfico, objetivando padronizar as medidas do nível ósseo peri-implantar. A quantificação do nível ósseo peri-implantar foi feita no momento do diagnóstico, 12 meses após a primeira avaliação. A altura do osso peri-implantar foi dada em função da quantidade de roscas expostas no implante (Quadro 1).

Quadro 1. Altura do osso peri-implantar em função da exposição do implante.

0 (zero) =	sem perda óssea patológica
1=	uma rosca exposta
2=	duas roscas expostas
3=	três roscas expostas
4=	quatro roscas expostas
5=	cinco roscas expostas
6=	seis ou mais roscas expostas
7=	perda óssea total ou perda do implante

3.2.2 Processamento laboratorial

3.2.2.1 Coleta do material biológico

As amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico seguindo como base um protocolo previamente publicado (Kuchler et al., 2012) e foram armazenadas

no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. Os indivíduos realizaram um bochecho com 5 ml de solução salina durante 1 minuto. Todo o volume do bochecho foi acondicionado em tubos para centrífuga de 15 ml e mantido a -20°C . O material coletado foi processado, armazenado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Cada tubo contendo a suspensão salivar foi centrifugado a 550 G durante 10 minutos para sedimentação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado em hipoclorito de sódio a 2,5% e o *pellet* ressuscitado em 1 ml de tampão de extração (TE) (Tris-HCl 10 mM, pH 7,8; EDTA 5 mM; SDS 0,5%). Posteriormente, o material biológico foi transferido para um tubo de 1,5 ml e congelado a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.2.2.2 Extração do DNA

As amostras foram descongeladas e incubadas com 100 ng/ml de Proteinase K em banho-maria a 56°C *overnight* e submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400 μL de solução de acetato de amônio a 10 M. A seguir, todos os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos e centrifugados por 15 minutos (12000 rpm). O sobrenadante foi dividido em dois tubos de 700 μL cada. O mesmo volume de álcool isopropílico gelado (700 μL) foi adicionado em cada espécime e agitado manualmente de maneira vigorosa. Foi observada a formação de "nuvem de DNA" em cada espécime de todas as alíquotas que posteriormente foram centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm. Então o sobrenadante foi descartado com cuidado para não deslocar o *pellet* de DNA, e 1 ml de etanol 70% gelado foi adicionado e centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o tubo aberto e emborcado em papel para secar por pelo menos 30 minutos e evaporar o excesso de etanol 70%. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 50 μL de TE e congelado a -20°C .

3.2.2.3 Avaliação da quantidade e da pureza do DNA

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se 2 μL do material extraído. A concentração de DNA foi avaliada em um comprimento de onda de 260 nm. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280 nm foi usada para estimar a pureza

do DNA genômico. Somente as amostras de DNA com razão 260/280 acima de 1,8 foram incluídas neste estudo.

3.2.2.4 Seleção dos Polimorfismos e Genotipagem

Foram avaliados os genes RANK, RANKL e OPG (Tabela 1). O método utilizado para as reações foi o de TaqMan (Ranade, Chang et al., 2001) com sondas específicas para a distinção alélica (sondas TaqMan). As sondas TaqMan baseiam-se na identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos. Além do primer, um par de sondas se anela sobre uma pequena seqüência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos, o polimórfico e o tipo selvagem. As sondas apresentam um fluoróforo que absorve a energia luminosa emitida pelo termociclador (neste estudo foi utilizado o Applied Biosystem 7500) que dissipa na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Essa fluorescência é então detectada pelo aparelho.

A reação de PCR em tempo real foi realizada contendo um volume final de 3 µL (4 ng de DNA/reação, 1,5 µL de TaqMan PCR master mix, 0,075 de SNP assay-byDesign (Applied Biosystems-Foster City, CA) e água deionizada q.s.p.). Para amplificação 40 ciclos foram realizados de 95°C por 10 minutos, 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Tabela 1. Descrição das variações genéticas estudadas

<i>Gene</i>	<i>Símbolo do Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Região cromossômica</i>	<i>Seqüência</i>	<i>MAF</i>
RANK <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11a, NFκB Activator</i>	TNFRSF11A	<i>rs3826620</i>	<i>18q21.33</i>	<i>GTGATTCAC[G/T]CTG CAGGCC</i>	0.349
RANKL <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily, Member 11</i>	TNFSF11	<i>rs9594738</i>	<i>13q14.11</i>	<i>ATATCTGCTA[C/T]GA AGCTTTG</i>	0.284
OPG <i>Tumor necrosis fator receptor superfamily member 11b</i>	TNFRSF11B	<i>rs2073618[#]</i>	<i>8q.24.12</i>	<i>AATGAACAA[C/G]TTG CTGTGC</i>	0.333

Obtido a partir da base de dados: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://genome.ucsc.edu>. MAF: Minor Allele Frequency (Frequência do Alelo Menor); negrito indica alelo mutante.

Variante missense (troca de uma lisina por asparagina).

3.3 Avaliação Estatística

A estatística descritiva foi utilizada para apresentar características demográficas da amostra. Teste de Kruskal-Wallis, X^2 (com correção de Yate para continuidade, quando necessário) ou exato de Fisher foram realizados para analisar características entre os grupos de acordo com o status peri-implantar. Os testes X^2 ou exato de Fisher também foram usados para determinar a associação entre o genótipo ou distribuição alélica dos polimorfismos com qualquer status peri-implantar. Regressão logística foi realizada e ajustada para o genótipo e todas as variáveis influenciando a condição peri-implantar. O teste X^2 também foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas as análises foram realizadas usando testes bicaudais ($\alpha = 0,05$) no Epi Info 3.5.2. (www.cdc.gov/epiinfo).

4. Resultados

4. RESULTADOS

Dos 114 indivíduos incluídos no presente estudo, 71 apresentavam uma condição periimplantar saudável e 43 uma doença (30 com mucosite e 13 com peri-implantite). Idade, biótipo peri-implantar, diabetes e presença de placa peri-implantar foram associados à mucosite, enquanto idade, biótipo peri-implantar, tabagismo e etilismo, doença periodontal e placa peri-implantar foram associados à presença de periimplantite ($P \leq 0,05$). As características demográficas da amostra são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características de base dos participantes de acordo com o status peri-implantar.

Grupos	Saudável (n = 71)	Mucosite (n = 30)	Peri-implantite (n = 13)	Doença (Mucosite + Peri-implantite) (n = 43)	P value		
					Saudável vs. Mucosite	Saudável vs. Peri-implantite	Saudável vs. Doença
Idade							
Min	19	32	27	27			
Max	82	75	77	77			
Median	33	50	52	51	< 0.001*	0.001*	< 0.001*
Média (SD)	35.7 (13.0)	51 (12.5)	50 (14.1)	50.7 (12.9)			
Gênero n (%)							
Masculino	28 (39.4)	12 (40.0)	6 (46.2)	18 (41.9)	0.865	0.884	0.953
Feminino	43 (60.6)	18 (60.0)	7 (53.8)	25 (58.1)			
Biotipo peri-implantar n(%)							
Grosso	56 (78.9)	14 (46.7)	5 (38.5)	19 (44.2)	0.003*	0.008*	< 0.001*
Fino	15 (21.1)	16 (53.3)	8 (61.5)	24 (55.8)			
Hábito de fumar n (%)							
Fumante	10 (14.1)	2 (6.7)	7 (53.8)	9 (20.9)	0.244	0.004*	0.489
Não fumante	61 (85.9)	28 (93.3)	6 (46.2)	34 (79.1)			
Diabetes n (%)							
Sim	1 (1.4)	5 (16.7)	2 (15.4)	7 (16.3)	0.009*	0.061	0.004*
Não	70 (98.6)	25 (83.3)	11 (84.6)	36 (83.7)			
Doença periodontal n (%)							
Sim	18 (25.4)	13 (43.3)	9 (69.2)	22 (51.2)	0.120	0.003*	0.009*
Não	53 (74.6)	17 (56.7)	4 (30.8)	21 (48.8)			
Placa peri-implantar n (%)							
Presença	47 (66.2)	29 (96.7)	13 (100.0)	42 (97.7)	0.003*	0.032*	< 0.001*
Ausência	24 (33.8)	1 (3.3)	0 (0.0)	1 (2.3)			
Hábito consumir bebida alcoólica n (%)							
Alcoólico	15 (21.1)	5 (16.7)	7 (53.8)	12 (27.9)	0.810	0.021*	0.550
Não alcoólico	56 (78.9)	25 (83.3)	6 (46.2)	31 (72.1)			
Uso de medicação n (%)							
Sim	27 (38.0)	13 (43.3)	9 (69.2)	22 (51.2)	0.783	0.074	0.239
Não	44 (62.0)	17 (56.7)	4 (30.8)	21 (48.8)			

* $P \leq 0.05$ indica associação estatisticamente significativa

Não houve associação entre a condição peri-implantar e qualquer polimorfismo avaliado nos genes RANK, RANKL ou OPG ($P > 0,05$) (Tabela 3). A regressão logística confirmou os resultados anteriores. A análise multivariada mostrou que ter uma idade mais avançada (OR = 6,14; IC95% = 1,95-19,38; $P = 0,002$) e um biótipo peri-implantar fino (OR = 3,41; IC 95% = 1,03-11,24; $P = 0,044$) aumentaram o risco de apresentar uma condição de peri-implante doente, enquanto a ausência de placa peri-implantar diminuiu o risco (OR = 0,06; 95% IC = 0,01-0,58; $P = 0,015$) (Tabela 4).

Tabela 3. Genótipo e frequências alélicas de acordo com o status peri-implantar

	Saudável (n = 71) n (%)	Mucosite (n = 30) n (%)	Peri-implantite (n = 13) n (%)	Doença (Mucosite + Peri-implantite) (n = 43) n (%)	P valor		
					Saudável vs. Mucosite	Saudável vs. Peri-implantite	Saudável vs. Doença
RANK rs3826620							
GG	33 (46.5)	14 (46.7)	9 (69.2)	23 (53.5)	0.978	0.214	0.742
GT	35 (49.3)	15 (50.0)	3 (23.1)	18 (41.9)			
TT	3 (4.2)	1 (3.3)	1 (7.7)	2 (4.7)			
G	101 (71.1)	43 (71.7)	21 (80.8)	64 (74.4)	0.920	0.439	0.699
T	41 (28.9)	17 (28.3)	5 (19.2)	22 (25.6)			
RANKL rs9594738							
CC	34 (47.9)	12 (40.0)	4 (30.8)	16 (37.2)	0.478	0.522	0.420
CT	29 (40.8)	16 (53.3)	7 (53.8)	23 (53.5)			
TT	8 (11.3)	2 (6.7)	2 (15.4)	4 (9.3)			
C	97 (68.3)	40 (66.7)	15 (57.7)	55 (64.0)	0.999	0.406	0.597
T	45 (31.7)	20 (33.3)	11 (42.3)	31 (36.0)			
OPG rs2073618							
CC	22 (33.3)	11 (40.7)	6 (60.0)	17 (45.9)	0.703	0.221	0.444
CG	30 (45.5)	12 (44.4)	2 (20.0)	14 (37.8)			
GG	14 (21.2)	4 (14.8)	2 (20.0)	6 (16.2)			
C	74 (56.1)	34 (63.0)	14 (70.0)	48 (64.9)	0.484	0.351	0.277
G	58 (43.9)	20 (37.0)	6 (30.0)	26 (35.1)			

Tabela 4. Análise de regressão para a variável de desfecho “status peri-implantar doente” (Mucosite + Peri-implantite)

Variáveis	Análise univariada		Análise multivariada	
	P valor	OR (95% CI)	P valor	OR (95% CI)
RANK rs3826620				
GG	Referência		Referência	
GT	0.444	0.74 (0.34 - 1.61)	0.257	0.51 (0.16 - 1.63)
TT	0.963	0.96 (0.15 - 6.19)	0.414	0.33 (0.02 - 4.71)
RANKL rs9594738				
CC	Referência		Referência	
CT	0.205	1.69 (0.75 - 3.78)	0.744	1.22 (0.38 - 3.91)
TT	0.929	1.06 (0.28 - 4.06)	0.977	1.03 (0.16 - 6.52)
OPG rs2073618				
CC	Referência		Referência	
CG	0.270	0.69 (0.25 - 1.48)	0.178	0.43 (0.12 - 1.47)
GG	0.314	0.56 (0.18 - 1.75)	0.146	0.29 (0.05 - 1.54)
Age				
≤ 38 years	Referência		Referência	
> 38 years	< 0.001*	7.35 (3.09 - 17.51)	0.002*	6.14 (1.95 - 19.38)
Biotipo Peri-implantar				
Grosso	Referência		Referência	
Fino	< 0.001*	4.72 (2.06 - 10.80)	0.044*	3.41 (1.03 - 11.24)
Hábito de fumar				
Fumante	Referência		Referência	
Não fumante	0.345	0.62 (0.23 - 1.67)	0.303	0.39 (0.07 - 2.33)
Diabetes				
Sim	Referência		Referência	
Não	0.016*	0.07 (0.01 - 0.62)	0.186	0.05 (0.00 - 4.06)
Doença periodontal				
Sim	Referência		Referência	
Não	0.006*	0.32 (0.15 - 0.72)	0.361	0.56 (0.16 - 1.96)
Placa peri-implantar				
Presença	Referência		Referência	
Ausência	0.003*	0.05 (0.01 - 0.36)	0.015*	0.06 (0.01 - 0.58)
Hábito de beber álcool				
Alcoólico	Referência		Referência	
Não alcoólico	0.410	0.69 (0.29 - 1.66)	0.783	0.82 (0.20 - 3.43)

* $P \leq 0.05$ indica associação estatisticamente significativa

5. *Discussão*

5. DISCUSSÃO

Em analogia à gengivite e periodontite que afetam o periodonto dos dentes naturais, a mucosite é uma reação inflamatória reversível confinada aos tecidos moles peri-implantares, e a peri-implantite é um processo irreversível que afeta o tecido mole e o osso de suporte ao redor dos implantes na função oclusal (Duarte et al., 2009; Heitz-Mayfield, 2008; Klinge, Gustafsson e Berglundh, 2002; Smeets et al., 2014).

Considerado uma das possíveis falhas do implante dentário, o polimorfismo genético pode afetar os níveis de expressão gênica e produção ou funções de proteínas; como consequência, eles influenciam a secreção de citocinas inflamatórias e regulam as respostas inflamatórias. O sucesso clínico dos implantes dentários é baseado na osseointegração, e qualquer resposta inflamatória intensa pode estimular a reabsorção dos ossos de suporte e danificar esse processo, levando à falha do implante (Mo et al., 2016).

Em publicações científicas atuais, não há muitos estudos sobre a relação de polimorfismos em genes do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β (RANK), Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kappa β (RANK-L) e Osteoprotegerina (OPG) com essas doenças peri-implantares. O presente estudo é um dos primeiros a avaliar essa associação na população brasileira (Kadkhodazadeh et al., 2012; Kadkhodazadeh et al., 2014; Kadkhodazadeh et al., 2016; Zhou e Zhao, 2016).

O RANK é expresso nas superfícies de células precursoras de osteoclastos e osteoclastos maduros em resposta a uma variedade de influências, incluindo vários fatores de transcrição e a citocina, fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que é produzido por células osteoblásticas na medula óssea. Células osteoblásticas expressam o ligante para RANK, RANKL, em suas superfícies, que é essencial para a diferenciação de osteoclastos; essas células também produzem osteoprotegerina (OPG), um receptor que se liga ao RANKL e impede sua ligação ao RANK, limitando assim a formação de osteoclastos. As concentrações relativas de RANKL e OPG determinam a extensão da proliferação e diferenciação de células precursoras de osteoclastos na massa óssea (Duarte et al., 2009; Sarlati et al., 2010; Boyce et al., 2012; Lapérine et al., 2016; González-Galván et al., 2018;).

Diante da escassez de pesquisas, o presente trabalho estudou se existe associação de polimorfismos nos genes de RANK, RANK-L e OPG nas patologias peri-implantares. Para avaliar essa relação do polimorfismo nesses genes, a metodologia foi realizada por meio de

processamento laboratorial incluindo a coleta do material biológico, extração do DNA, avaliação da quantidade e da pureza do DNA, e seleção dos polimorfismos e genotipagem.

Os resultados obtidos mostraram que não houve associação entre a condição perimplantar e qualquer polimorfismo avaliado nos genes RANK, RANKL ou OPG. Os achados estão de acordo com os de Sarlati et al. (2010), Arakan, Buduneli e Kutukçuler (2008), e Monov et al. (2006) em que não foram encontradas correlações significativas entre os níveis de RANKL no fluido crevicular peri-implantar e parâmetros clínicos do implante. Arikan et al. (2008) em seus estudos identificaram que as concentrações de RANKL, as quantidades totais de OPG e as concentrações de OPG foram significativamente menores no grupo peri-implantite quando comparado ao grupo saudável.

No entanto, Duarte et al. (2009) mostraram em seus estudos uma regulação positiva do RANKL e uma regulação negativa dos níveis de OPG nos grupos de pacientes com peri-implantite, favorecendo a reabsorção óssea peri-implantar através de reduções na razão OPG / RANKL. Os autores avaliaram a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias [IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-4 e IL-10] e fatores relacionados à osteoclastogênese (RANKL e OPG) em locais que exibem diferentes gravidades da doença peri-implantar inflamatória. Concluíram que expressões de fatores relacionados a inflamação e osteoclastogênese podem ter um papel importante no surgimento e na gravidade das doenças peri-implantes.

Por outro lado, o presente estudo mostrou que a idade, biótipo peri-implantar, diabetes e presença de placa peri-implantar foram associados à mucosite, enquanto idade, biótipo peri-implantar, tabagismo e etilismo, doença periodontal e placa peri-implantar foram associados à presença de peri-implantite. Os resultados encontrados estão de acordo com os estudos de Heitz-Mayfield (2008), Lindhe e Meyle (2008) e Smeets et al. (2014) que obtiveram os mesmos achados em suas pesquisas.

Na literatura, existem evidências substanciais de que os seguintes fatores estão associados doenças peri-implantares: má higiene bucal, história de periodontite e tabagismo. Evidências limitadas de que os seguintes fatores estão associados a doenças peri-implantares: diabetes e consumo de álcool. Também evidências conflitantes e limitadas para uma associação com doenças peri-implantares: traços genéticos e superfície do implante (Heitz-Mayfield, 2008; Lindhe e Meyle 2008; Smeets et al., 2014).

Diante do exposto, os resultados apresentados pelo presente estudo confirmam a não relação entre o polimorfismo nos genes do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β (RANK), Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kappa β (RANK-L) e Osteoprotegerina

(OPG) nas doenças peri-implantares, e a influência dos fatores de riscos já relatados na literatura sobre os casos de mucosite peri-implantar e peri-implantite.

Porém, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de avaliar outros polimorfismos que possivelmente tenham influência nas patologias peri-implantares, visando aprofundar os conhecimentos sobre as doenças que ocasionam a perda de implantes dentários.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

A partir da metodologia empregada e dos resultados obtidos na presente pesquisa, concluiu-se que não houve associação entre a condição peri-implantar e qualquer polimorfismo avaliado nos genes RANK, RANKL ou OPG. Idade, biótipo peri-implantar, diabetes, presença de placa peri-implantar, tabagismo, etilismo e doença periodontal foram associados às doenças peri-implantares.

Referências

REFERÊNCIAS

Albrektsson T, Isidor F. Criteria for success and failure of an implant system. Consensus report. In: Proceedings of the 1st European workshop on periodontology. Chicago, IL: Quintessence 1994: 243-244.

Arikan F, Buduneli N, Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Mar;19(3):283-8.

Behera J, Bala J, Nuru M, Tyagi SC, Tyagi N. Homocysteine as a Pathological Biomarker for Bone Disease. *J Cell Physiol* 2016 Nov 18.

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European journal of clinical investigation* 2012; 42(12), 1332-1341.

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and Oral Implant Failure: A Systematic Review. *J Dent Res* 2014; 93(9):859-867.

Claffey N, Clarke E, Polyzois I, Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 2008 Sep; 35(8 Suppl):316-32.

Consolaro A, Sant'Ana E, Lawall MA, Consolaro MF, Bacchi CE. Gingival juvenile xanthogranuloma in an adult patient: case report with immunohistochemical analysis and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009 Feb; 107(2):246-52.

Duarte PM, Mendonça AC, Máximo MBB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin. Oral Impl. Res* 2009; (20) 514–520.

González-Galván MDC, Mosqueda-Taylor A, Bologna-Molina R, Setien-Olarrá A, Marichalar-Mendia X, Aguirre-Urizar JM. Evaluation of the osteoclastogenic process associated with RANK / RANK-L / OPG in odontogenic myxomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018; 23(3):e315-9.

Hanaoka M, Gehrke SA, Mardegan F, Gennari CR, Taschieri S, Del Fabbro M, Corbella S. Influence of implant/abutment connection on stress distribution to implant-surrounding bone: a finite element analysis. *J Prosthodont* 2014 Oct; 23(7):565-71.

Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep; 35(8 Suppl):292-304.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigón A, Polyzois I, Salvi GE, Schwarz F, Serino G, Tomasi C, Zitzmann NU. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol* 2015; (16) 152-7.

Kadkhodazadeh M, Baghani Z, Ebadian AR, Kaghazchi Z, Amid R. Receptor activator of nuclear factor kappa-B gene polymorphisms in Iranian periodontitis and peri-implantitis patients. *J Periodontal Implant Sci* 2014 Jun;44(3):141-6.

Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis *Arch Oral Biol*. 2013 May;58(5):530-6.

Kadkhodazadeh M, Tabari ZA, Pourseyediyan T, Najafi K, Amid R. Relationship between Genetic Polymorphisms with Periodontitis and Peri-Implantitis in the Iranian Population: A Literature Review. *J Long Term Eff Med Implants* 2016; 26(2):183-190.

Klinge B, Gustafsson A, Berglundh T. A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29 Suppl 3:213-25; discussion 232-3. Review.

Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, Sourice S, Tilly EL, Palmer G, Davideau JL, Geoffroy V, Guicheux J, Beck-Cormier S, Lesclous P. Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis. *PLoS One* 2016 Dec 19;11(12)

Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008 Sep; 35(8 Suppl):282-5.

Melesse M, Choi E, Hall H, Walsh MJ, Geer MA, Hall MC. Timely activation of budding yeast APCCdh1 involves degradation of its inhibitor, Acm1, by an unconventional proteolytic mechanism. *PLoS One* 2014 Jul 29; 9(7):e103517.

Mo YY, Zeng XT, Weng H, Cen Y, Zhao Q, Wen X. Association between tumor necrosis factor-alpha G-308A polymorphism and dental peri-implant disease risk. *Medicine (Baltimore)* 2016 Aug; 95(35):e4425.

Monov G, Strbac GD, Baron M, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006; 8(3):135-41.

Ogata Y, Nakayama Y, Tatsumi J, Kubota T, Sato S, Nishida T, Takeuchi Y, Onitsuka T, Sakagami R, Nozaki T, Murakami S, Matsubara N, Tanaka M, Yoshino T, Ota J, Nakagawa T, Ishihara Y, Ito T, Saito A, Yamaki K, Matsuzaki E, Hidaka T, Sasaki D, Yaegashi T, Yasuda T, Shibutani T, Noguchi K, Araki H, Ikumi N, Aoyama Y, Kogai H, Nemoto K, Deguchi S, Takiguchi T, Yamamoto M, Inokuchi K, Ito T, Kado T, Furuichi Y, Kanazashi M, Gomi K, Takagi Y, Kubokawa K, Yoshinari N, Hasegawa Y, Hirose T, Sase T, Arita H, Kodama T, Shin K, Izumi Y, Yoshie H. Prevalence and risk factors for peri-implant diseases in Japanese adult dental patients. *J Oral Sci* 2017; 59(1):1-11.

Oliveira MC, Arntz OJ, Blaney Davidson EN, van Lent PL, Koenders MI, van der Kraan PM, van den Berg WB, Ferreira AV, van de Loo FA. Milk extracellular vesicles accelerate osteoblastogenesis but impair bone matrix formation. *J NutrBiochem* 2016 Apr; 30:74-84.

Sarlati F1, Sattari M, Gazar AG, Rafsenjani AN. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) levels in peri-implant crevicular fluid. *Iran J Immunol* 2010; 7(4):226-33.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. *Head & Face Medicine* 2014, 10:34.

Spelling PF. Avaliação do sistema osteoprotegerina e RANKL em pacientes com artrite idiopática juvenil de início poliarticular. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Departamento de Clínica Médica. Disciplina de Reumatologia.

Xing L, Xiu Y, Boyce BF. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop* 2012 Dec 18; 3(12):212-22.

Zhou J, Zhao Y. Osteoprotegerin Gene (OPG) Polymorphisms Associated with Peri-implantitis Susceptibility in a Chinese Han Population. *Med Sci Monit* 2016 Nov 9;22:4271-4276.

Anexos

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RANK, RANKL E OPG NAS DOENÇAS PERI-IMPLANTARES.

Pesquisador Responsável: Raphael Carvalho e Silva

Telefones para contato: (92) 98141-6160

Nome do Voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

O Sr.(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RANK, RANKL E OPG NAS DOENÇAS PERI-IMPLANTARES” de responsabilidade do pesquisador Raphael Carvalho e Sila, que objetiva identificar os fatores de risco para instalação de implantes dentários, através da avaliação clínica da gengiva, por radiografias, e por meio de coleta da saliva para análise laboratorial. Esses procedimentos não são prejudiciais. O Sr. (a) receberá qualquer informação (respostas e esclarecimentos) a dúvidas acerca dos procedimentos, se haverá riscos, benefícios, e sobre o seu tratamento. Sua identidade se manterá em caráter confidencial incluindo as informações contidas em seu prontuário que puderem interferir na sua privacidade. A região estudada poderá ser fotografada, mas o seu rosto não aparecerá em nenhuma foto de modo a te identificar. O Sr. (a) tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em posteriores tratamentos que possa vir a necessitar dentro desta Instituição ou em outras.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Cirurgião-dentista que obteve o consentimento: _____

Testemunha: _____ Testemunha: _____

Exame clínico específico:

Região							
Tipo de implante							
Fabricante							
Fenótipo Peri-implantar							
Sangramento espontâneo							
Sangramento à sondagem							
Cor da Mucosa							
PCS							
Placa Peri-implantar							
Perda óssea RX							